

厚生労働省科学研究研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

糖鎖担持カルボシラン dendrimer 製剤の
設計技術開発に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 照沼 大陽

平成17（2005）年 4月

分担研究者	名取 泰博	(国立国際医療センター)
	西川 喜代孝	(国立国際医療センター)
	平野 弘之	((株) ジーエスプラッツ)
	松岡 浩司	(埼玉大学)
	幡野 健	(埼玉大学)

目 次

I. 総括研究報告	1
糖鎖担持カルボシランデンドリマー製剤の設計技術開発に関する研究 照沼大陽、松岡浩司、幡野健、森 知紀	
A. 研究目的	2
B. 結果および考察	3
B-1. グロボ三糖担持カルボシランデンドリマーの系統的合成と生物活性評価	
B-2. グロボ三糖担持カルボシランデンドリマーによるペロ毒素結合サイトの検討	
B-3. グロボ三糖の大量合成実施に向けて	
B-4. 本コンセプト適用範囲の拡張・シアリルラクトースの大量合成	
B-5. 本コンセプト適用範囲の拡張・ラクトネオテトラオース誘導体の合成と カルボシランデンドリマーへの集積化	
C. 結論	17
D. 健康危険情報	17
E. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）	17
II. 分担研究報告	18
II-1. 糖鎖担持カルボシランデンドリマーの生理活性評価及び病理学的解析 名取泰博	
II-2. 糖鎖担持カルボシランデンドリマー実用化のための調査報告 平野弘之	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	35
IV. 研究成果の刊行物・別刷	41

I. 総括研究報告

平成16年度 厚生労働省科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進事業）
総括研究報告書

糖鎖担持カルボシランデンドリマー製剤の設計技術開発に関する研究

主任研究者 照沼 大陽 埼玉大学 教授
分担研究者 松岡 浩司 埼玉大学 助教授
分担研究者 幡野 健 埼玉大学 助手
森 知紀 医療機器センター 流動研究員

分担研究者 名取 泰博 国立国際医療センター研究所 部長
分担研究者 西川喜代孝 国立国際医療センター研究所 室長
分担研究者 平野 弘之 株式会社ジーエスプラッツ 部長

研究要旨

平成15年度までに病原性大腸菌 0157:H7 が産生するペロ毒素を効果的に中和する、まったく新しい形の化合物を創成した。これらを基として平成16年度は、より効果の高い化合物の開発およびこのコンセプトの拡張を目指して検討を行った。

本研究の中心的課題であるグロボ三糖担持カルボシランデンドリマーについて、最適構造の決定を行い Dumbbell (1) 6 が最適であり、これまでに合成した17個のグロボ三糖カルボシランデンドリマー中 Dumbbell (1) 6 および Dumbbell (2) 18 が *in vivo* において強い中和活性を示す化合物であると結論した。これらのことからグロボ三糖担持カルボシランデンドリマーの構造とペロ毒素中和活性の間には強い相関があることを実証することが出来た。また、ペロ毒素の結合サイトについて詳細な検討を行い、これまで述べられていた結合サイト1および2よりも結合サイト3が重要な役割を担っていることを明らかとした。

一方、グロボ三糖の実用的な合成方法の確立に向けて、実験室レベルでの検討を行った後、実用レベルでの生産のための準備を行った。

さらに、機能性糖鎖をカルボシランデンドリマーに担持するコンセプトを拡張することを目的として、インフルエンザウイルスに接着するシアリルラクトースの個体における実験を行うべくシアリルラクトース担持カルボシランデンドリマーの大量合成、ならびに新規機能性糖鎖として Dengue 熱ウイルスに接着するラクトー *N*-ネオテトラオースを担持したカルボシランデンドリマーの合成について検討した。

A. 研究目的

研究の背景と目的

0157による感染は平成9年に起きた堺市での集団感染を始めとして毎年のように発生し、特に体力の弱い老人・小児に感染した場合死に至る場合もある。その治療法は現在も確立されていない。大腸菌 0157 自体は抗生物質の投与により死滅させることが可能ではあるが、大腸菌 0157 は死滅する間に大量のペロ毒素を放出する性質があり治療にあたる医師が抗生物質投与に踏み切れないのが現状である。このような状況を背景として、ペロ毒素を効率よく中和する医薬品の開発が強く望まれている。ペロ毒素中和剤については、マウスを用いるヒト化抗体が臨床段階との報道がある。また、お茶あるいはホップに含まれるカテキン類などが有効との記事がマスコミに登場したが、明確な構造を有する化合物が生体中で効果を発揮する化合物に関する報告は無かった。

我々はカルボシラン dendrimer の表面に糖鎖（グロボ三糖）を担持した、これまでまったく知られていない構造を有する、糖鎖を機能性基とするカルボシラン dendrimer を合成し（図1）（埼玉大学）、そのペロ毒素中和活性を調べた（国際医療センター）。その結果、そのペロ毒素中和活性

は糖鎖の数および dendrimer の構造に強く依存することを見出した。さらに、図1に示す Dumbbell (I) 6 は、*in vitro* のみならず *in vivo*（マウス）で効果を発揮することを明らかとした。これは明確な構造を有する化合物が、個体レベルで 0157 の中和作用を明確に示した世界で最初の例である。

カルボシラン dendrimer は、その合成が比較的容易であり、担体の形状および担持糖鎖数を望み通りに作り上げることが可能である。従って、ペロ毒素の場合と同様に受容体部分に適するサイズならば担持糖鎖数を備えたカルボシラン dendrimer の分子設計が可能となる。実際に医薬品として利用するためには、カルボシラン dendrimer 自体の毒性等に関する検討が不可欠であるが、カルボシラン dendrimer は対象とする各種毒素あるいはウイルスの形状に使用するカルボシラン dendrimer を適合する形状・サイズに調製した化合物を合成できる。このようなコンセプトは実用的な医薬品としての利用することの可能性とともに、医薬品としての作用機構の具体的知見を得ることが可能となることから医薬品開発の指針作成に関連し強いインパクトを与える可能性が期待できる。

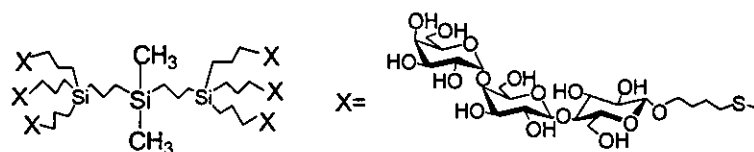


図1. グロボ三糖担持カルボシラン dendrimer の例 (Dumbbell (I) 6)

B. 結果と考察

B-1. グロボ三糖担持カルボシラン dendリマーの系統的合成と生物活性評価

以下の3つの化合物 (Fan (0)3, Dumbbell (1)6, Ball (1)12 : 括弧内は dendリマー世代数、末尾数字は担持糖鎖数) を代表例として結果を述べる。これら化合物を合成後、国立国際医療センターおよび奈良医科大の共同研究者に生物活性の評価をお願いした。ペロ毒素中和に対する *in vitro* の IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) はそれぞれ100以上、2.3および1.3であった。マウスを用いる *in vivo* の試験の結果、Dumbbell (1)6 は100%の救命効果を示したが *in vivo* で同等以上の効果を示した Ball (1)12 はほとんど効果が無いことが明らかとなった。このことはカルボシラン dendリマーの構造と担持糖鎖数が中和効果に強く相関していることを示している。

平成15年度には、Dumbbell (1)6 をリード化合物として3つのグループに分類し、カルボシラン dendリマーの合成を行い、

それぞれにグロボ三糖誘導体を導入した。同時にカルボシラン dendリマーと糖鎖間の距離を調整するため、これまで用いていたアグリコンメチレン数4個に加えて、メチレン数5個および6個のグロボ三糖誘導体をあらたに合成し、それぞれを Dumbbell (1)6 骨格のカルボシラン dendリマーに導入した (図3)。

今年度はこれらグロボ三糖担持カルボシラン dendリマーの生物活性測定をすべて完了した。これまでに合成したグロボ三糖カルボシラン dendリマーの結果を総合して以下の結論を得た。

1) Dumbbell 型の担持数を変えたグループ1では、担持数4以上で強い *in vitro* 活性が発現する。

2) Dumbbell 型のカルボシラン dendリマー構造を変化させたグループ2では、いずれも *in vitro* 活性が発現したが Dumbbell (1)6 を越える活性を示す化合物は見いだされなかった。

3) グロボ三糖とカルボシラン dendリマー間のスペーサー長を変化させたグループ

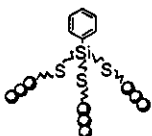
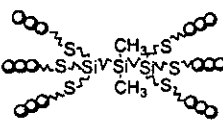
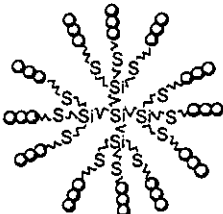
			
	Fan(0)3	Dumbbell(1)6	Ball(1)12
<i>In vitro</i> IC_{50} (mg/mL)	>100	2.3	1.3
<i>In vivo</i>	×	◎	×

図2. 代表的グロボ三糖担持カルボシラン dendリマーのペロ毒素中和効果

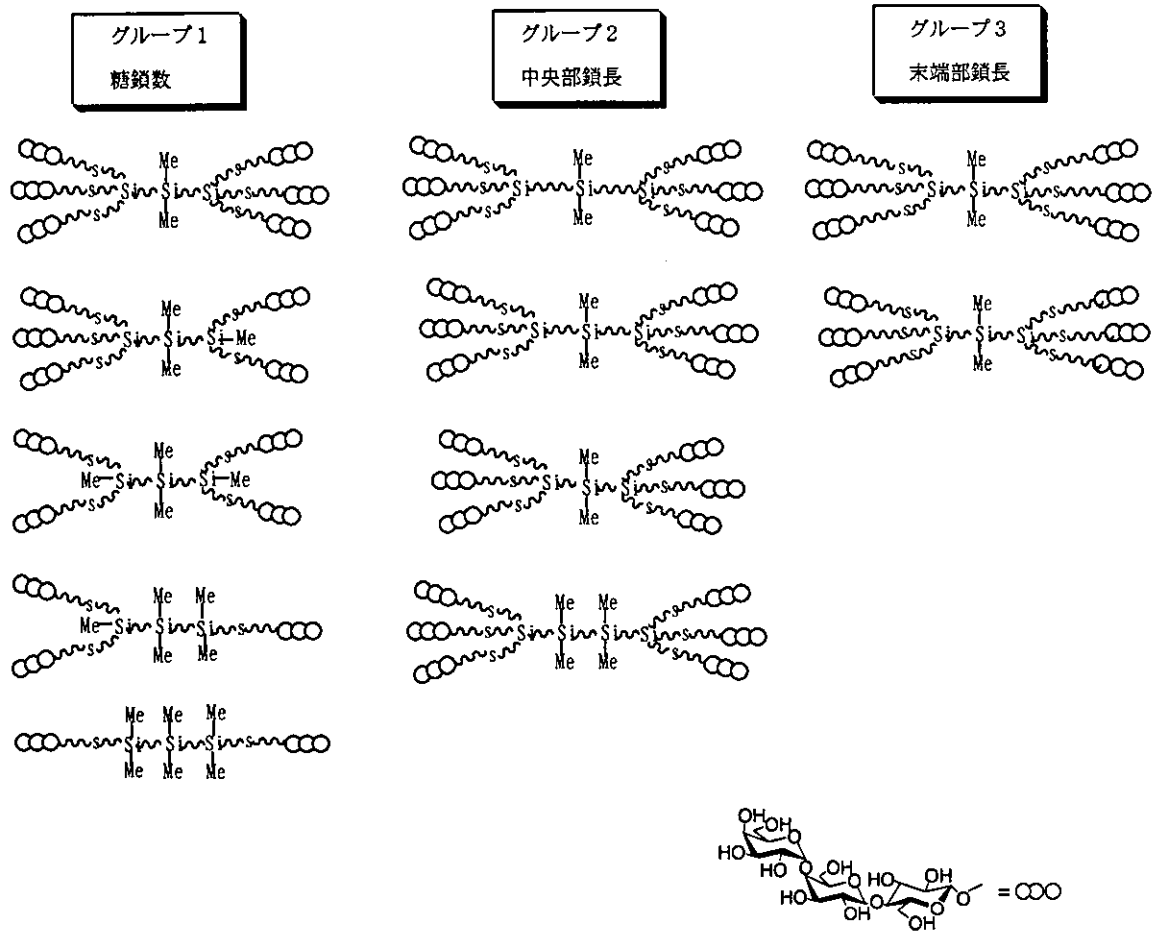


図3. Dumbbell (1) 6 をリード化合物として合成した
グロボ三糖担カルボシランデンドリマー

3 の場合も Dumbbell (1) 6 を越える強い活性を発現しなかった。

以上の結果を以前に行った結果と総合的にまとめることにより以下の最終結論に至った。

「ペロ毒素中和活性と担体として使用するカルボシランデンドリマーの構造および担持糖鎖数に明確な相関が認められ、Dumbbell (1) 6 および Dumbbell (2) 18 (図4) のみが *in vitro* および *in vivo* できわめて強いペロ毒素中和活性を示す」

このようにペロ毒素中和活性がカルボシランデンドリマー構造に強く依存する理由は明らかではないが、¹²⁵I で標識したペロ毒素 Stx2 を用いた実験において、Dumbbell (1) 6 を個体に投与する実験でペロ毒素が腎臓・肝臓に多く分布することが分かった。従って、現時点では、Dumbbell (1) 6 を個体に投与した場合には血液中に存在するペロ毒素に Dumbbell (1) 6 が接着し、その接着体が腎臓に移動し、その後マクロファージによりペロ毒素が効率よく分解・解毒されているものと考えている。

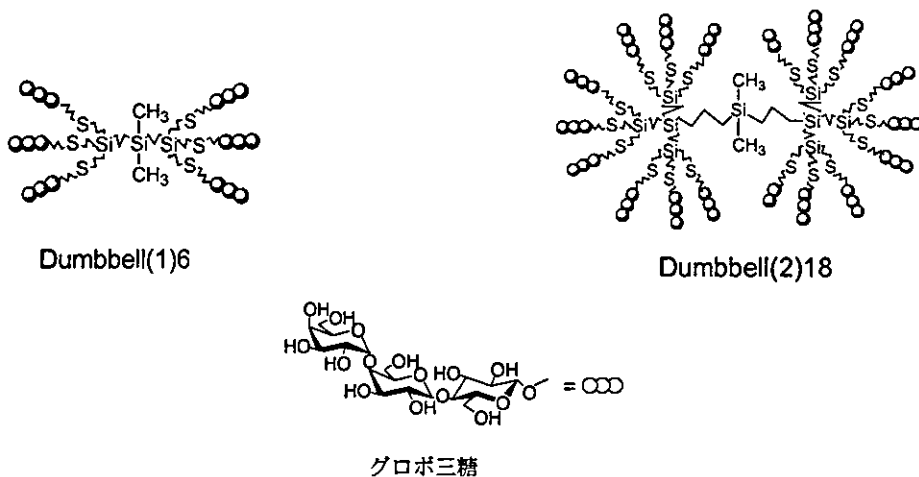


図4. In vivo でペロ毒素中和活性を示した
グロボ三糖担持カルボシラン dendリマー

以上のことにより、Dumbbell (1) 6 および Dumbbell (2) 18 は実用的なペロ毒素中和剤として十分に期待できる化合物であると考えられるが、以下の検討課題が残されている。

- 1) カルボシラン dendリマーの体内動態を調査し安全性を確認する。
- 2) 実用レベルでグロボ三糖の大量合成法を確立する。

B-2. グロボ三糖担持カルボシラン dendリマーによるペロ毒素結合サイトの検討

ペロ毒素は志賀様毒素の一種であり AB₅型の構造を有し、接着機能を有する B サブユニットには3つの結合サイトが存在し、これまでは外側に位置する結合サイト1および2が重要なサイトと考えられていた。今回 Stx1 および Stx2 の B サブユニットの結合サイト変異体を調製し、Dumbbell (2) 18 を用いて検討を行ったところ、Dumbbell (2) 18 とペロ毒素の結合において、結合サイト3がより重要な役割を担っている

ことが初めて明らかとなった。詳細については分担者報告 (II-1) に記載する。

B-3. グロボ三糖の大量合成実施に向けて

多種類の糖鎖が天然に存在し特異的な機能を発揮している。しかしそれらの多くはきわめて少量しか存在していないことが多い。したがって、機能性糖鎖を医薬品等に利用するにはその調製法の開発が不可欠となる。糖転移酵素の使用が一つの有力な方法ではあるが、現在、我々はグロボ三糖をグラムスケールで獲得することを前提として合成的手法を採用している。

実際、すでに大量合成の経路を確立し数十グラムスケールでのグロボ三糖合成を実施した。この方法を基本として、本研究の分担研究者であるジーエスプラッツ株式会社、平野弘之氏が平成16年度 JST 委託開発事業に応募し、最終的採択には至らなかったものの、書類審査を通過することができた。詳細については分担者報告 (II-2) に記載する。

B-4. 本コンセプト適用範囲の拡張・シアリルラクトースの大量合成

上記成果をもとに、我々が提案してきた機能性糖鎖カルボシランデンドリマーの適用範囲の拡張、一般化することを試みた。

具体的な機能性糖鎖として、インフルエンザウイルスに強く接着するシアリルラクトース、シアリルラクトサミン、あるいは Dengue 熱ウイルスに接着するパラグロポシドなどを取り上げることとした。これら糖鎖をカルボシランデンドリマー上に集積化し、糖鎖単体よりもその接着能を飛躍的に向上させることができれば医薬品として応用の可能性が広がる。上記 B-3 に述べたように、天然に存在する機能性糖鎖はきわめて微量であるため、それらの合成法の確立が不可欠である。

ここでは、シアリルラクトース誘導体の大量合成について検討した結果を記載する。

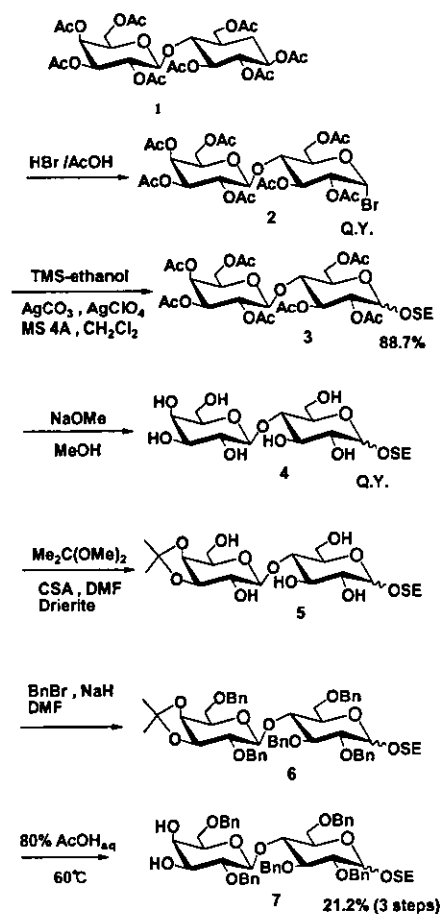
まず、ラクトース誘導体 (7) を式 1 の経路により合成した。

一方、グリコシルドナーであるシアル酸誘導体 (10) を合成した (式 2)。

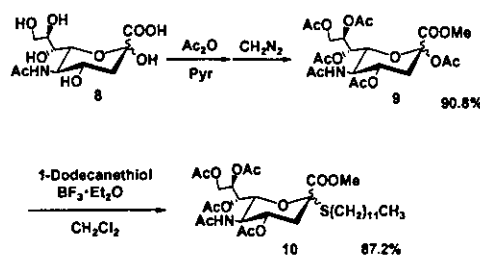
こうして得た 7 と 10 を用いてシアリルラクトース誘導体を合成した (式 3)

さらに、カルボシランデンドリマーに導入するため、アグリコンとしてチオアセチル基を有する誘導体 (16) を得た (式 4)。

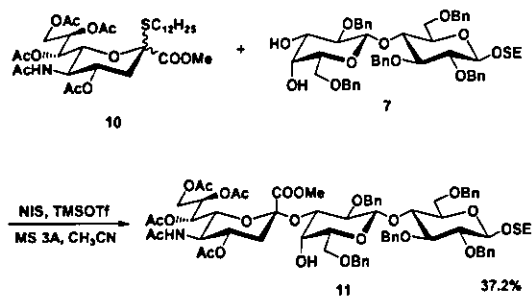
こうして合成した 16 を末端臭素化したカルボシランデンドリマー (17) に作用させて最終目的物であるシアリルラクトース担持カルボシランデンドリマー (19) を合成した (式 5)。



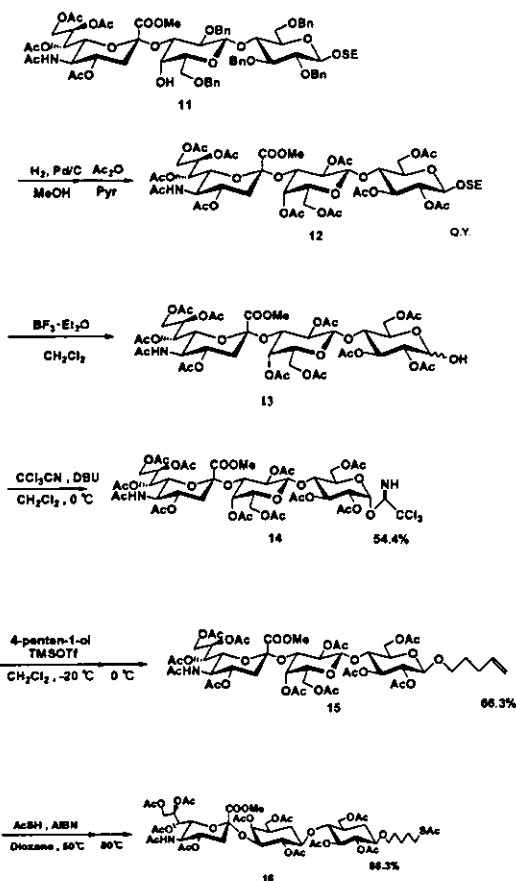
式 1. ラクトース誘導体の合成



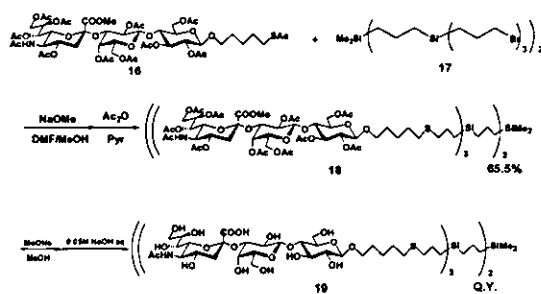
式 2. シアル酸誘導体の合成



式3. シアリルラクトース誘導体の合成



式4. チオアセチル基を有するシアリルラクトース誘導体の合成



式5. シアリルラクトース担持カルボシランデンドリマーの合成

以下、実験方法の詳細について記載する。

溶媒

本実験では抽出及びシリカゲルカラムクロマトグラフィーには市販の1級溶媒を使用し、反応溶媒として用いたメタノールには市販の特級品に活性化した合成ゼオライトA-3を加え1, 2-ジクロロエタン、ジクロロメタン、アセトニトリル、DMF、ピリジンは市販の特級品に活性化した合成ゼオライトA-4を加えて乾燥させ、一晩以上静置したものの上澄みを使用した。

<分析方法>

- NMR : BRUKER AM-400型、Varian Gemini 2000型核磁気共鳴分光計を使用した。測定溶媒は重クロロホルム、重水を使用し、基準物質にはテトラメチルシラン(重クロロホルム)と残存プロトン(重水)として測定を行った。
- IR : 日本分光 FT/IR-300型赤外分光計を使用し、KBr錠剤として測定した。
- 融点測定器 : 三田村理研工業 melt-temp2 を使用した。
- 薄膜クロマトグラフ (TLC) : MERCK TLC

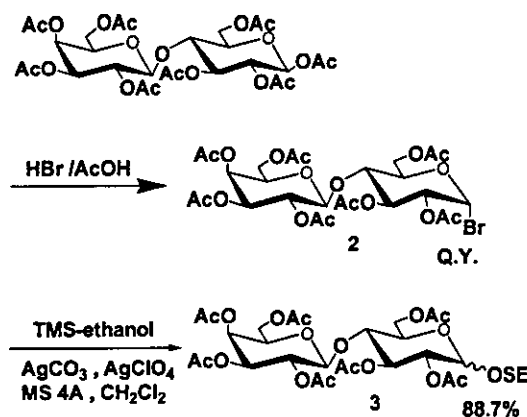
plates silica gel 60 F₂₅₄ 0.25 mm を 50×10 mm に切って使用した。

GPC

リサイクル分取HPLC 液体クロマトグラフ (LC-918R型)、カラムJAIGEL 3H+2.5H (20φ×600mm 2本)、2H (20φ×300mm 2本)+1H (20φ×600mm 1本)、示差屈折計RI-50型を使用し、溶離液にはクロロホルムを用いた。(日本分析工業)

ラクトース受容体の合成

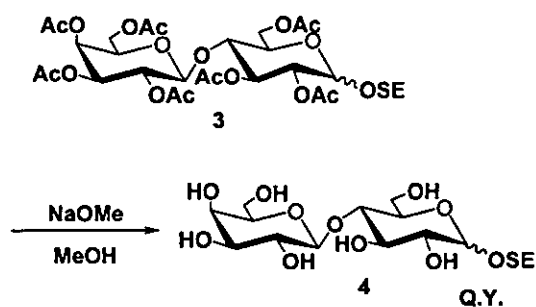
2-(Trimethylsilyl)ethyl 4-O-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl)-2,3,6-tri-O-acetyl-D-glucopyranoside(3).



ラクトース-β-アセテート体 1 (50 g, 73.6 mmol) に酢酸 (100 mL)、無水酢酸 (10 mL)、30% 臭化水素-酢酸溶液 (29.4 mL) を加え、密栓をして遮光し室温で 3 時間攪拌した。反応液をクロロホルムで抽出し、氷水、冷飽和炭酸水素ナトリウム、飽和食塩水の順に洗浄を行い、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。この有機層をろ過し、ろ液を濃縮し、残渣を、ジクロロメタン (250 mL)

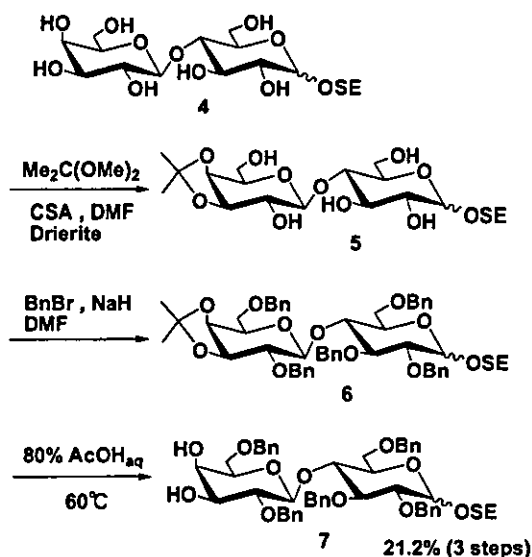
に溶解し、MS 4A (25 g) を加え遮光し室温で 2 時間攪拌した。そこに、ジクロロメタン (150 mL) に炭酸銀 (20.3 g, 73.6 mmol)、過塩素酸銀 (15.3 g, 73.6 mmol)、トリメチルシリルエタノール (25 mL, 184.0 mmol)、MS 4A (25 g) を加え、遮光し室温で 2 時間攪拌した反応液を氷冷下に加え、室温に戻し、1 時間遮光攪拌した。反応液をセライトろ過し、ろ液をクロロホルムで希釈し、飽和食塩水で洗浄し、有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した。この有機層をろ過し、ろ液を濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル 5:4 (v/v)] で精製しトリメチルシリルエチルグリコシド誘導体 3 (48.1 g, 88.7%) を得た。

2-(Trimethylsilyl)ethyl 4-O-D-galactopyranosyl-D-glucopyranoside (4).



トリメチルシリルグリコシド誘導体 3 (48.1 g, 65.3 mmol) をメタノール (350 mL) に溶解し、ナトリウムメトキシド (1.76 g, 32.7 mmol) を加え、室温で 2 時間攪拌した。反応液を強酸性陽イオン交換樹脂 IR120B (H⁺) で中和後、イオン交換樹脂をろ取し、ろ液を濃縮した。残渣に脱保護されたトリメチルシリルグリコシド 4 (29.6 g) を得た。

2-(Trimethylsilyl)ethyl 4-O-(2,6-di-O-benzyl-1-β-D-galactopyranosyl)-2,3,6-tri-O-benzyl-1-D-glucopyranoside (7).

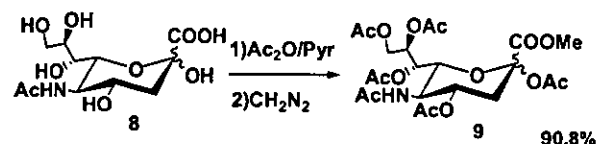


トリメチルシリルグリコシド 4 (29.6 g, 66.9 mmol) を DMF (300 mL) に溶解し、2, 2-dimethoxypropane (16.5 mL, 133.8 mmol)、Drierite (29.6 g) を加え、室温で 1 時間攪拌した。カンファスルホン酸を反応液が pH3-4 になるまで加え、反応液を 80 ° C に加熱し、TLC で反応の終了を確認後、室温に戻し炭酸水素ナトリウムを加え数分間攪拌した。反応液をろ過後、ろ液を濃縮し、3', 4'-*O*-イソプロピリデン化体 5 を得た。得られた 5 をそのまま、DMF (200 mL) に溶解し、氷冷した水素化ナトリウム (30.6 g, 637.5 mmol) の DMF (400 mL) 溶液に滴下した。氷冷下、ベンジルプロミド (75.9 mL, 637.5 mmol) を滴下し、室温に戻し一晩攪拌した。TLC で反応の終了を確認後、氷冷しメタノールを加え、濃縮した。残渣をクロロホルムに溶解し、冷 1 M 塩酸、冷飽和炭酸水素ナトリウム、飽和食塩水の順に洗浄を行い、

有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。この有機層をろ過し、ろ液を濃縮し、2, 3, 6, 2', 6'-ペンタベンジル化体 6 を得た。得られたペンタベンジル化体 6 を 80% 酢酸水溶液 (500 mL) に溶解し、60 ° C に加温後、一晩攪拌した。反応液を濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサケ-酢酸エチル 2:1 (v/v)] で精製し、3', 4'-ジオール体 7 (12.7 g, 21.2%) を得た。

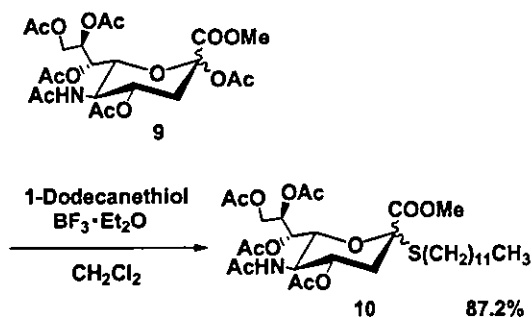
シアル酸供与体の合成

Methyl-5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-O-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galacto-2-nulopyranosonate (9).



N-アセチルノイラミン酸 8 (30.1 g, 99.4 mmol) をピリジン (200 mL) に溶解し、攪拌氷冷した。無水酢酸 (236 mL, 2486 mmol) を滴下後、反応液を室温に戻して一晩攪拌した。反応液を濃縮し、メタノール-ジエチルエーテル (2:1 (v/v), 300 mL) に溶解した。氷冷後、ジアゾメタンエーテル溶液を滴下した。TLC で反応が完全に進行したのを確認後、酢酸を加え余剰量のジアゾメタンの処理を行った。反応液を濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー [酢酸エチル] で精製し、アセテートメチルエステル体 9 (48.2 g, 90.8%) を得た。

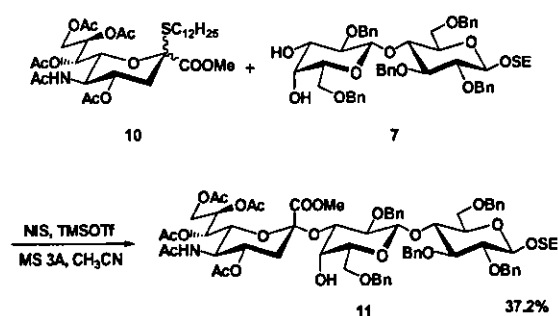
Methyl (lauryl-5-acetoamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-2-thio- β -D-glycero- β -D-galacto-2-nonulopyranoside) onate(10).



シアル酸アセチルメチルエステル体 9 (36.7 g, 68.7 mmol) をジクロロメタン (350 mL) に溶解し、ドデカンチオール (65.8 mL, 274.8 mmol) を加え氷冷した。三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体 (25.9 mL, 206.1 mmol) を滴下後、30分攪拌し室温に戻して3時間攪拌した。反応液をクロロホルムで希釈し、冷水、冷飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水の順に洗浄し、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥した。この有機層をろ過し、ろ液を濃縮後、シリカゲルクロマトグラフィー [トルエン-酢酸エチル (1:3)] で精製し、チオラウリル体 10 (40.5 g, 87.2%) を得た。

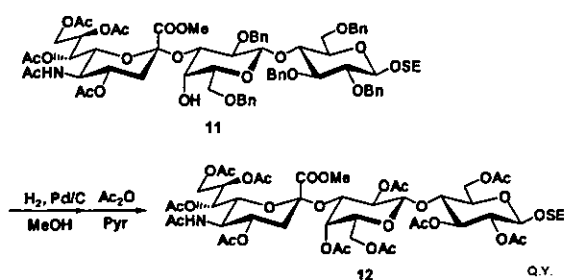
シアリルラクトース誘導体の合成

2-(Trimethylsilyl)ethyl [Methyl (5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- β -D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosyl)onate]-(2 \rightarrow 3)-*O*-(2,6-di-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-benzyl- β -D-glucopyranoside (11).



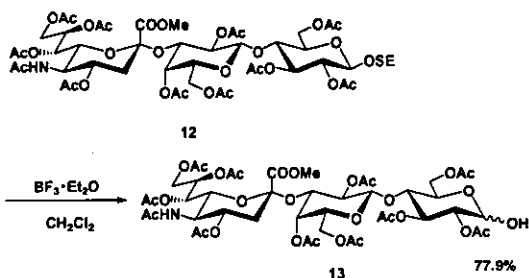
シアル酸チオラウリル体 10 (19.3 g, 27.9 mmol)、ジオール 7 (12.7 g, 14.3 mmol) をアセトニトリル (250 mL) に溶解し、MS 3A (40 g) を加え、数時間攪拌した。反応液を -35°C に冷却し、*N*-ヨードコハク酸イミド (12.5 g, 55.7 mmol)、トリフルオロメタンスルホン酸 (1.0 mL, 5.6 mmol) の順に加え、4時間攪拌した。反応液をクロロホルムで希釈し、セライトろ過を行った。ろ液を、冷1M炭酸ナトリウム水溶液、1Mチオ硫酸ナトリウム水溶液、飽和食塩水の順に抽出を行い、有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した。この有機層をろ過し、ろ液を濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル 2:3 (v/v)] で精製し、3糖誘導体 11 (7.24 g, 37.2%) を得た。

2-(Trimethylsilyl)ethyl [Methyl (5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- β -glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosyl)onate]-(2 \rightarrow 3)-*O*-(2,4,6-tri-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl- β -D-lucopyranoside (12).



三糖誘導体 11 (7.24 g) をメタノール (72 mL) に溶解し、パラジウム/活性炭 (5 g) を加え、水素雰囲気下、接触還元装置を用いて激しく攪拌した。反応の終了を TLC で確認後、反応液をセライトろ過した。ろ液を濃縮後、ピリジン (20 mL)、無水酢酸 (10 mL) を加え、室温で一晩攪拌した。反応液を濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー [酢酸エチル-トルエン 3:1 (v/v)] で精製し、三糖完全アセチル化体 12 を得た。

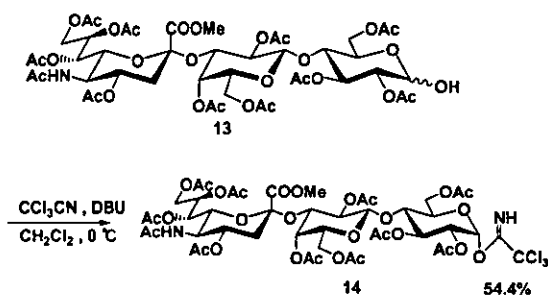
[Methyl (5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-gaacto-2-nonulopyranosyl)onate]-(2 \rightarrow 3)-*O*-(2,4,6-tri-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl- β -D-glucopyranoside (13).



三糖完全アセチル化体 12 (6.18 g, 5.29 mmol) をジクロロメタン (200 mL) に溶解し、氷冷下、ボロントリフルオライドエチルエーテル錯体 (2.1 mL, 16.6 mmol) を滴下し、氷冷下 2 時間攪拌した。反応液を室温に戻しさらに 2 時間攪拌した。反応液を冷飽和炭

酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水の順に洗浄し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。この有機層をろ過し、ろ液を濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー [酢酸エチル] で精製し、還元性 3 糖誘導体 13 (4.4 g, 77.9%) を得た。

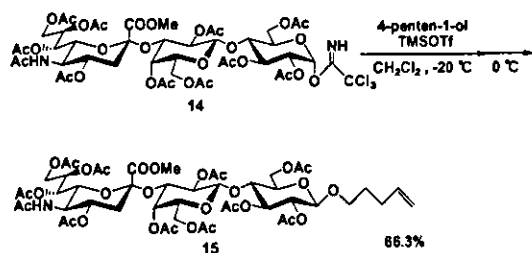
[Methyl (5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-gaacto-2-nonulopyranosyl)onate]-(2 \rightarrow 3)-*O*-(2,4,6-tri-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl Trichloroacetimidate (14).



還元性三糖誘導体 13 (4.66 g, 4.36 mmol) をジクロロメタン (50 mL) に溶解し、トリクロロアセトニトリル (13.2 mL, 131 mmol) を加え、 -10°C に冷却した。1,8-ジアザビシクロ [5.4.0] ウデセン-7-エン (261 μ L, 1.74 mmol) を加え、 0°C で 3 時間攪拌する。反応液を濃縮し、残渣として α -トリクロロアセトイミデート体 14 (3.62 g, 68.4%) を得た。

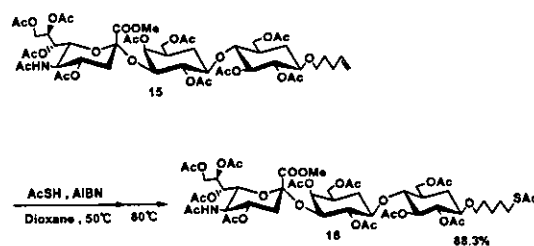
Pentenyl [Methyl (5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-gaacto-2-nonulopyranosyl)onate]-(2 \rightarrow 3)-*O*-(2,4,6-tri-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-(\rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl- β -D-glucopyrano

side (15).



α -トリクロロアセトイミデート体 14 (2.79 g, 2.30 mmol) をジクロロメタン (50 mL) に溶解し、4-ペンテン-1-オール (1.19 mL, 11.5 mmol)、MS 4A (2.3 g) を加え、 -20°C に冷却した。ポロントリフルオリドエチルエーテル錯体 (296 μL , 4.60 mmol) を加え、1 時間攪拌する。反応液を 0°C に戻し、さらに 4 時間攪拌する。反応液をセライトろ過し、ろ液を冷飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水の順に洗浄し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。この有機層をろ過し、ろ液を濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー [酢酸エチル] で精製し、三糖ペンテニルグリコシド誘導体 15 (1.73 g, 66.3%) を得た。

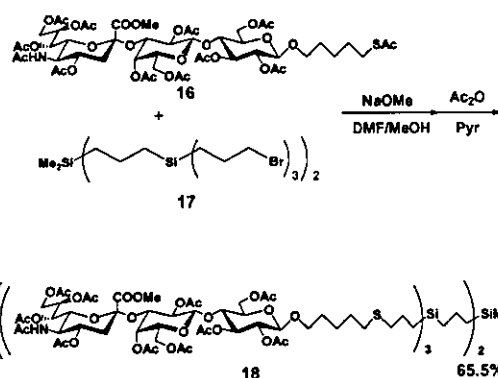
β -Acetylthio-pentenyl [Methyl (5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy-D-glucero- α -D-gaacto-2-nonulopyranosyl)onate]-(2 \rightarrow 3)-O-(2,4,6-tri-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-acetyl- β -D-glucopyranoside (16).



三糖ペンテニルグリコシド誘導体 15 (2.54 g, 2.23 mmol) を 1,4-ジオキサン (5.42 mL) に溶解し、チオ酢酸 (5.42 mL, 75.85 mmol) を加え、 50°C に加温した。AIBN (733 mg, 4.46 mmol) を加え、 80°C に加温した。3 時間攪拌後、室温に冷却しシクロヘキセン (15.37 mL, 151.71 mmol) を加え数分間攪拌した。反応液にトルエンを加え共沸濃縮後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [トルエン \rightarrow 酢酸エチル] で精製し、三糖チオアセチル体 16 (2.39 g, 88.3%) を得た。

シアリルラクトース担持カルボシランデンドリマーの合成

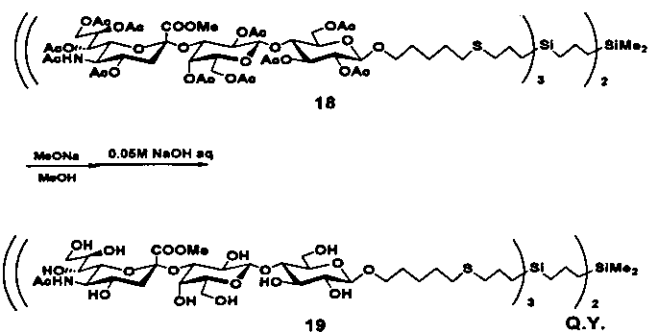
Dumbbell(1)6-SLac(OAc)(18).



Dumbbell (1) 6-Br デンドリマー 17 (150 mg, 161 \cdot mol) と 3 糖アセチルチオペンタナルグリコシド誘導体 16 (1.87 g, 1.55 mmol) を DMF / MeOH 1:1 (v/v) (4 mL) に溶解し、ナトリウムメトキシド (92.1 mg, 1.71 mmol)

1)を加え、室温で一晩攪拌した。酢酸 (1 mL)を加えた後、メタノールを除去し、ピリジン (8 mL)、無水酢酸 (8 mL)を加え一晩攪拌した。アセチル化が完了したのを確認後、反応液を濃縮した。残渣をクロロホルムで希釈し、氷水、冷飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水の順に洗浄し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。この有機層をろ過し、ろ液を濃縮後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [クロロホルム-メタノール 30:1 (v/v)]で精製し、さらに GPC による精製を行い Dumbbell (1) 6-SLac (OAc) 18 (786 mg, 65.5%)を得た

Dumbbell(1)6-amido-SLac(OH)(19).



Dumbbell (1) 6- SLac (OAc) 18 (53 mg, 7.1 μmol)をメタノール (2 mL)に溶解し、ナトリウムメトキシド (2.3 mg, 42.6 μmol)を加え、室温で3時間攪拌した。反応液に 0.05 M 水酸化ナトリウム水溶液 (1 mL)を加え、室温で一晩攪拌した。反応液を強酸性陽イオン交換樹脂 DOWEX 50W-X8 (H⁺)で中和後、イオン交換樹脂をろ取し、ろ液を濃縮後、セファデックス G-25 (5%酢酸水溶液)によるゲルろ過精製を行い、凍結乾燥により脱保護された

Dumbbell (1) 6-amide-SLac (OH) 19 を得た。

B-5. 本コンセプト適用範囲の拡張・ラクトネオテトラオース誘導体の合成とカルボシランデンドリマーへの集積化

研究協力者 山田 明宏

生体内の細胞表層上には、糖タンパク質や糖脂質などの複合糖質中の糖鎖が外側に向かってアンテナ状に存在している。生体内に侵入してきたウイルスや細菌はこれらの糖鎖をマーカーとし感染することが知られている。近年低濃度でしかも極めて効率よく抗ウイルス性を誘引させる糖鎖クラスター効果が注目を集めている。そのためデンドリマー末端や直鎖状ポリマーの側鎖に生理活性糖鎖を担持させたグライコクラスターモデルの構築が盛んに行われている。特に支持体としてデンドリマーを用いた場合は、分子の形状を制御したクラスターモデルを構築することができる大きな特徴である。我々はケイ素を分岐原子とするカルボシランデンドリマーを用いたグライコクラスターモデルの構築を行ってきた。

これまで我々はβ-シクロデキストリン、グロボ三糖、シアリルラクトースなどのクラスター化を報告している。特にグロボ三糖を担持したカルボシランデンドリマーのペロ毒素中和剤の開発において、担持した糖鎖数およびカルボシランデンドリマーの形状とペロ毒素中和活性の間には明確な構造活性相関があることを明らかにした。このコンセプトの拡張を図るために、本報告では機能性糖鎖としてラクト-N-ネオテトラオースを選択した(図5)。ラクト-N-ネオテトラオースはラクトサミンおよびラクトースからなる4糖構造をとっており、各種腫瘍の原因菌であるブドウ球菌と接着することで知られている糖鎖である。また近年、ラクトネオテトラオースはデングウイルスと接着し、デングウイルスの細胞への感染を阻害することも明らかになっている。

糖鎖受容体はD-ラクトースを原料として合成を行った(式6)。スペーサーとしてペンテニル基を導入し脱Oアセチル化した後に3',4'位をイソプロピリデン

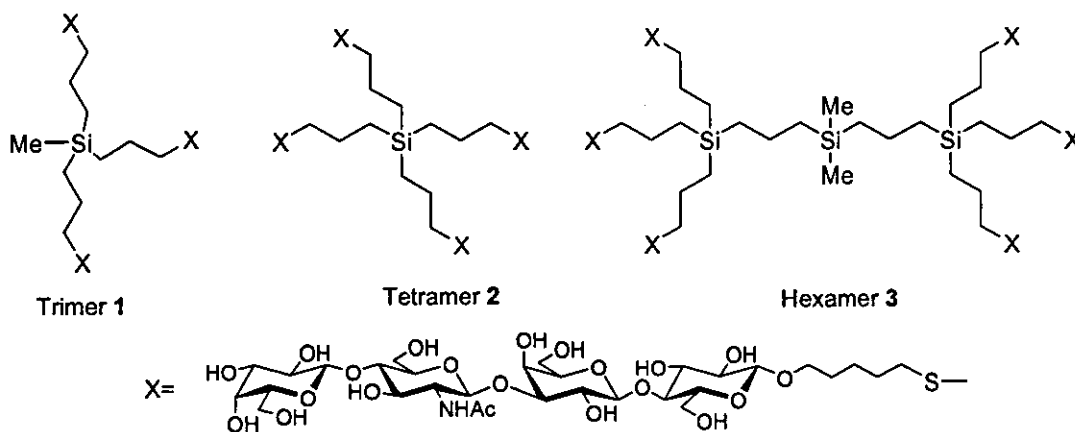
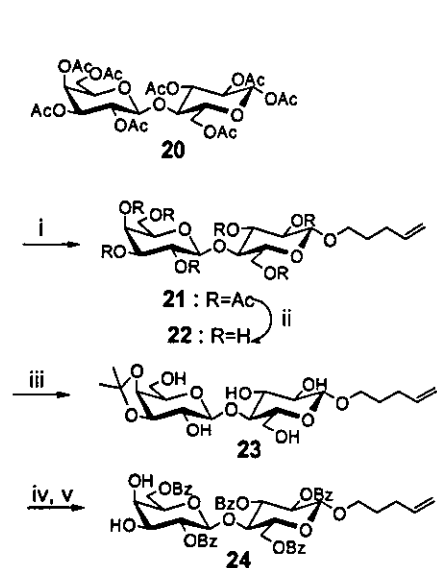


図5. ラクト-N-ネオテトラオース担持カルボシランデンドリマー

保護した。

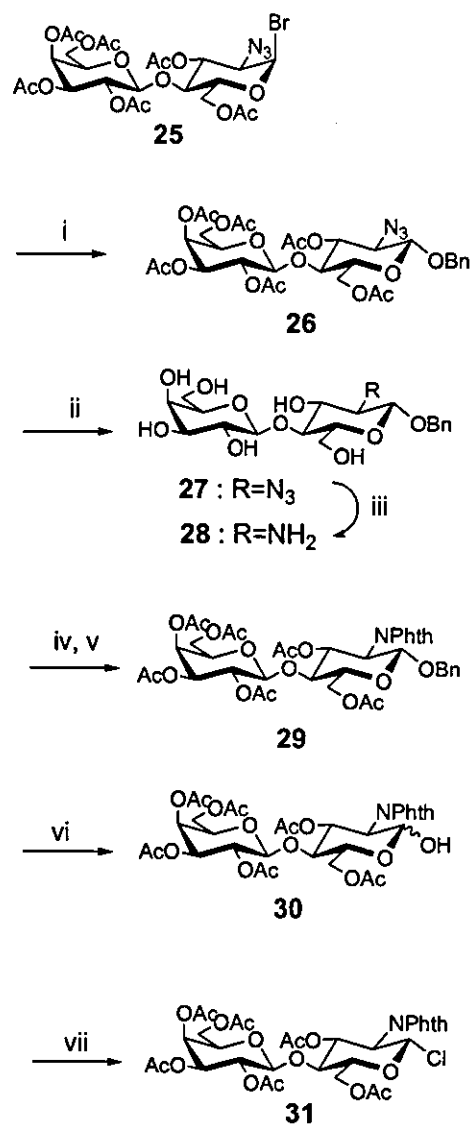


(i) 4-pentene-1-ol, $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, CH_2Cl_2 ;
 (ii) MeONa , MeOH , r.t.; (iii) $\text{Me}_2\text{C}(\text{OMe})_2$, CSA,
 DMF , 80°C ; (iv) BzCl , pyridine, r.t.;
 (v) 50% CF_3COOH aq., CH_2Cl_2 , r.t.

式 6. 糖受容体の合成

その後残りの水酸基をアシル転移が起こりにくいとされるベンゾイル基で保護を行った。酸性条件下でイソプロピリデン保護を外す際にアシル転移体と思われる副生成物がほんのわずかに生成していたが、収率 77% で糖鎖受容体 24 を得ることができた。24 をアセチル化することにより 24 のジオールの存在を ^1H NMR (CDCl_3) で δ 2.03 (s, 3H), 1.83 (s, 3H)、 ^{13}C NMR (CDCl_3) で δ 20.41, 20.32 (CH_3COO -) と 2 つのアセチル基由来のシグナルが観測されたことから確認した。

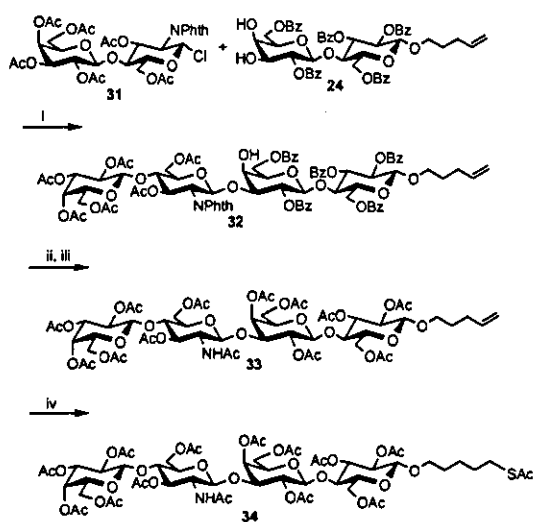
一方、糖鎖供与体は Lemieux らの報告に準じて合成を行い化合物 9 から 6 段階の反応により収率 33% で化合物 31 を得た (式 7)。この 31 の融点は報告されている値とほぼ一致した。



(i) BnOH , Ag_2CO_3 , Drierite, CH_3NO_2 , -20°C ;
 (ii) NaOMe , MeOH , r.t.; (iii) H_2S , Et_3N , pyridine;
 (iv) Phthalic anhydride, Et_3N , pyridine, 70°C ; (v) Ac_2O , pyridine, 90°C ;
 (vi) H_2 , 20% $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$, EtOAc , EtOH ;
 (vii) Vilsmeier Reagent, *sym*-collidine, CH_2Cl_2 , r.t.

式 7. 糖供与体の合成

これら糖鎖受容体と供与体とのグリコシル化反応により収率 76% で四糖構造を構築した (式 8)。

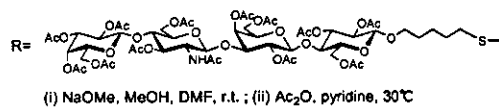
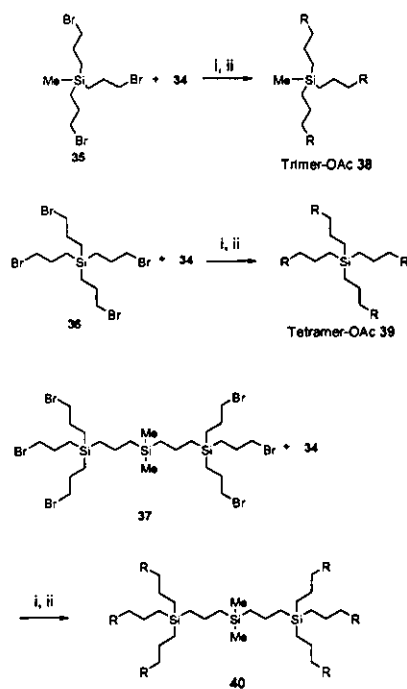


- (i) AgOTf, MS 4A powder, CH₃NO₂, 0°C→r.t.
(ii) n-BuNH₂, MeOH, reflux ;(iii) Ac₂O, pyridine ;
(iv) AcSH, AIBN, 1,4-dioxane, 80°C

式 8. 四糖の合成

¹³C NMR においてアノメリック位由来の 4 つのシグナルが、EI-MS スペクトルにより (Calc. for [M+Na]⁺:1685, Found: 1685) 構造を確認した。保護基の変換の後、スパーサーの二重結合へのチオ酢酸のラジカル付加により糖鎖誘導体 34 を収率 98% で合成した。これら四糖構造のオリゴ糖 32-34 の構造は ¹H, ¹³C NMR および質量分析、元素分析により確認した。

クラスター化の支持体として 3 つのカルボシラン dendリマー骨格 35-37 を用いた。糖鎖誘導体のカルボシラン dendリマーへの導入法はナトリウムメトキシドを用いてチオラートアニオンを発生させる導入反応を用いた (式 9)。それぞれの生成物はリサイクル分取型 HPLC で精製した。得られたアセチル体の 38-40 の収率はそれぞれ 64, 55, 44% と末端数が多くなるほど低下する傾向が見られた。構造決定は ¹H, ¹³C NMR および高分解能質量分析にて行った。六量体では

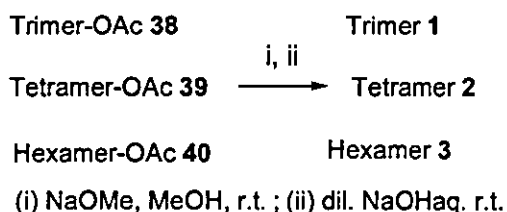


式 9. カルボシラン dendリマーへの導入

分子量が大きい為、高分解能測定を行うことができなかった。三量体 ESI-MS Calc. for [M+2Na]²⁺/2: 2107.1948 Found: 2107.1950, 四量体 Calc. for [M+2Na]²⁺/2: 2745.9075 Found: 2745.9112, 六量体 Calc. for [M+2Na]³⁺/3: 2799.84 Found: 2799.56.

これらアセチル保護したクラスター化合物をツェンプレ法およびけん化により脱 O-アセチル化することにより目的とする無保護のクラスター化合物 Trimer 1, Tetramer 2, Hexamer 3 をそれぞれ収率 100, 68, 96% で得ることができた (式 10)。これら無保護のクラスター化合物は水に対し非常に良

い溶解性を示した。



式10. ラクト-N-ネオテトラオース
担持カルボシランデンドリマーの合成

C. 結論

平成16年度の研究の結果、個体レベルで強力なペロ毒素中和活性を示す化合物はDumbbell (1) 6 およびDumbbell (2) 18であることが分かった。これらは、明確な構造を有する化合物がペロ毒素中和活性を示した最初の例である。ペロ毒素中和活性の作用機構に関して、これまで述べられていたBサブユニットの結合サイト1および2の重要性とは異なり、これまで重要視されていなかった結合サイト3が重要な役割を果たすことが明らかとなった。

機能的糖鎖担持カルボシランデンドリマーのコンセプトを他の機能的糖鎖（シアリルラクトースおよびラクト-N-ネオテトラオース）に拡張・適用できることが明らかとし、このコンセプトの有用性を証明した。

D. 健康危険情報

特になし

E. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1) ペロ毒素中和剤、松岡浩司、照沼大陽、幡野健、西川喜代孝、名取泰博、喜多英二、渡辺美帆、特願 2004-108483

2) 新規糖鎖担持カルボシランデンドリマーおよびその製造法、並びにデング熱ウイルス感染阻害剤、抗ウイルス剤および抗HIV剤のスクリーニング用標的物質、照沼大陽、幡野健、松岡浩司、鈴木康夫、左一八、特願 2004-124757

II. 分担研究報告

II-1. 生労働科学研究萌芽的先端医療技術推進研究 分担研究

糖鎖担持カルボシランデンドリマーの生理活性評価及び病理学的解析

分担研究者 国立国際医療センター研究所臨床薬理研究部 名取泰博

我々はこれまで、腸管出血性大腸菌の産生するペロ毒素/志賀毒素 (Stx) の中和剤として、Stx 受容体である中性糖脂質・Gb3 の糖鎖部分を分子内に多数有するカルボシランデンドリマーが有用であること、その活性発現には Dumbbell 型のデンドリマー構造で6個以上の糖鎖数が必要であることを明らかにした。今年度は Stx1 及び Stx2 の B サブユニット中の3種類の Gb3 結合サイトのうち、1つ、2つあるいは全てのサイトの Gb3 結合活性を失わせたミュータント B サブユニットを用いて、Dumbbell 型デンドリマーがどのサイトを利用して Stx を中和するかについて調べた。その結果、Dumbbell 型デンドリマーは Stx1 及び Stx2 のどちらの場合も、B サブユニットのサイト3に特異的に結合することが明らかとなった。Stx 全体の構造におけるサイト3の位置とデンドリマーの構造に関する考察を加えた。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌の産生するペロ毒素/志賀毒素 (Stx) やコレラ菌の産生するコレラ毒素など、ある種の細菌性腸管感染症の病原因子は糖脂質を受容体とする菌体外毒素である。これらの毒素は毒性の本体で酵素活性を担う A サブユニットと、受容体結合活性を有する B サブユニット5量体からなり、B サブユニット5量体が標的細胞の表面にある糖脂質クラスターに結合することが毒性発現に必須である。このことから、分子内に複数の受容体糖鎖を有する化合物はこれらの毒素と強く結合し、標的細胞への毒素の結合を阻害する可能性が考えられる。これまでこのアイデアに基づきいくつかの毒素中和剤が合成され、その活性について報告されたが、現在に至るまで、実際に薬剤として開発が進んでいる化合物はない。

腸管出血性大腸菌感染症における主な死因は脳症などの合併症であり、それらは体内に侵入した Stx が引き起こす。従って同菌感染後でも体内で Stx を中和し、合併症の発症を抑制する治療法が開発されれば、重症例や死亡例が減少すると期待される。腸管出血性大腸菌の産生する Stx には1型 (Stx1) と2型 (Stx2) があり、疫学研究

から Stx2 の方が臨床上重要と考えられている。しかし Stx1 に比べて Stx2 の研究は遅れており、またこれまで開発された Stx 中和剤は Stx2 に無効なものが多い。

これまで我々は、共同研究者の照沼、松岡らとともに、Stx 受容体である中性糖脂質 Gb3 (Gal α 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow ceramide) の糖鎖 (グロボ3糖) を分子内に含有するカルボシランデンドリマーの Stx 中和剤としての有効性を検討してきた。グロボ3糖の糖鎖を各々3、6、12個結合させた計3種類のデンドリマー (Super Twig と命名) の活性を調べたところ、糖鎖6及び12個の化合物が Stx に対して強い結合性を示し、培養細胞に対して毒性中和活性を示すことを発見した。さらにこのうち、糖鎖を6個有する化合物、Dumbbell(1)6 (Dumbbell とはデンドリマーの形を、括弧内の数字は世代数=分枝点の数を表わす) はマウスに対する Stx の致死活性を完全に抑制した。また Super Twig 投与で死を免れたマウスでは毒素の脳への沈着が減少し、脳の病理学的な所見が抑制されていたことから、ヒトの腸管出血性大腸菌感染症では脳症が死因となることが多いことを考え合わせると、Super Twig が臨床的にも有望であると期待された。さらに